

Farmaci antivirali

Il farmaco ideale interrompe la replicazione virale in un punto SPECIFICO ed ESSENZIALE del virus senza influenzare il normale metabolismo cellulare

Nonostante il notevole progresso della virologia negli ultimi 30 anni, lo sviluppo di farmaci antivirali è stato molto lento (con l'eccezione di HIV), e sono ancora poche le malattie virali per cui sono disponibili farmaci efficaci (soprattutto HIV, herpesvirus, epat C).

Ciò dipende da numerosi fattori:

- esistono molti meno possibili bersagli d'azione rispetto a batteri/antibiotici
- il metabolismo virale è così dipendente da quello cellulare che è difficile colpire l'uno senza danneggiare anche l'altro
- ogni virus ha meccanismi propri per cui è difficile che un farmaco agisca verso diverse specie virali - assenza di antivirali a largo spettro
- impossibilità di guarire infezioni latenti
- i costi di sviluppo spesso non sono giustificati dai presumibili profitti (i farmaci di maggior successo sono contro le infezioni croniche, perchè i trattamenti sono lunghi e spesso ripetuti)

Farmaci antivirali

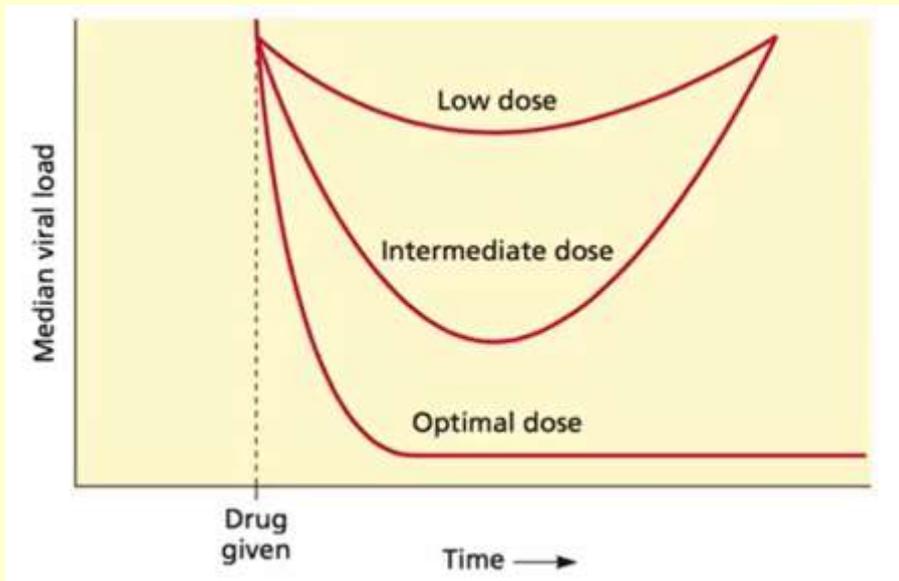
Un altro problema è dato dal fatto che molte infezioni virali hanno corta durata.

- quando il paziente si sente male, spesso è tardi per avere efficacia sulla malattia (il virus durante il periodo di incubazione ha già replicato in modo massiccio)
- il farmaco deve essere somministrato all'inizio dell'infezione
- non è saggio dare il farmaco alla popolazione sana (rapida insorgenza di mutanti resistenti)
- non esistono antivirali a largo spettro
- mancanza di approcci diagnostici veloci e precisi

Farmaci antivirali

Un'altra difficoltà nello sviluppo di antivirali è il fatto che l'efficacia deve essere pressochè assoluta.

Un farmaco può avere una efficacia anche inferiore al 100%, e l'effetto anche parziale può essere efficace (es. un enzima può essere bloccato per il 75%, e si avrà in miglioramento delle condizioni; qualsiasi cosa faccia l'aspirina non lo fa al 100%). Ma se un antivirale non ha efficacia vicina al 100%, inevitabilmente verranno selezionati mutanti virali resistenti



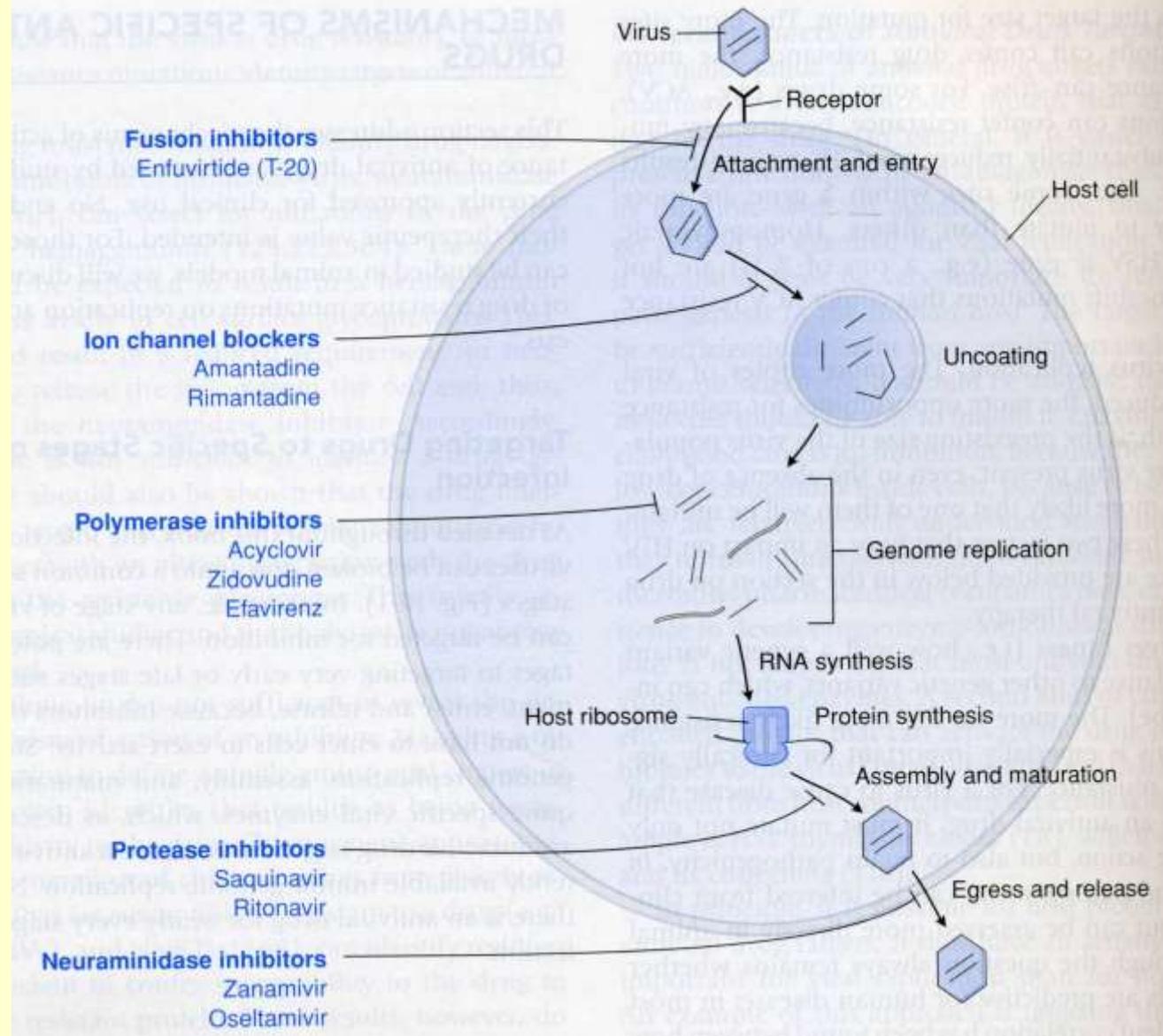
Esempio generico di dosaggio antivirale in un animale infettato:
La dose ottimale blocca la replicazione virale.

Una dose intermedia riduce la carica virale per un periodo di tempo, ma velocemente emergono mutanti resistenti.

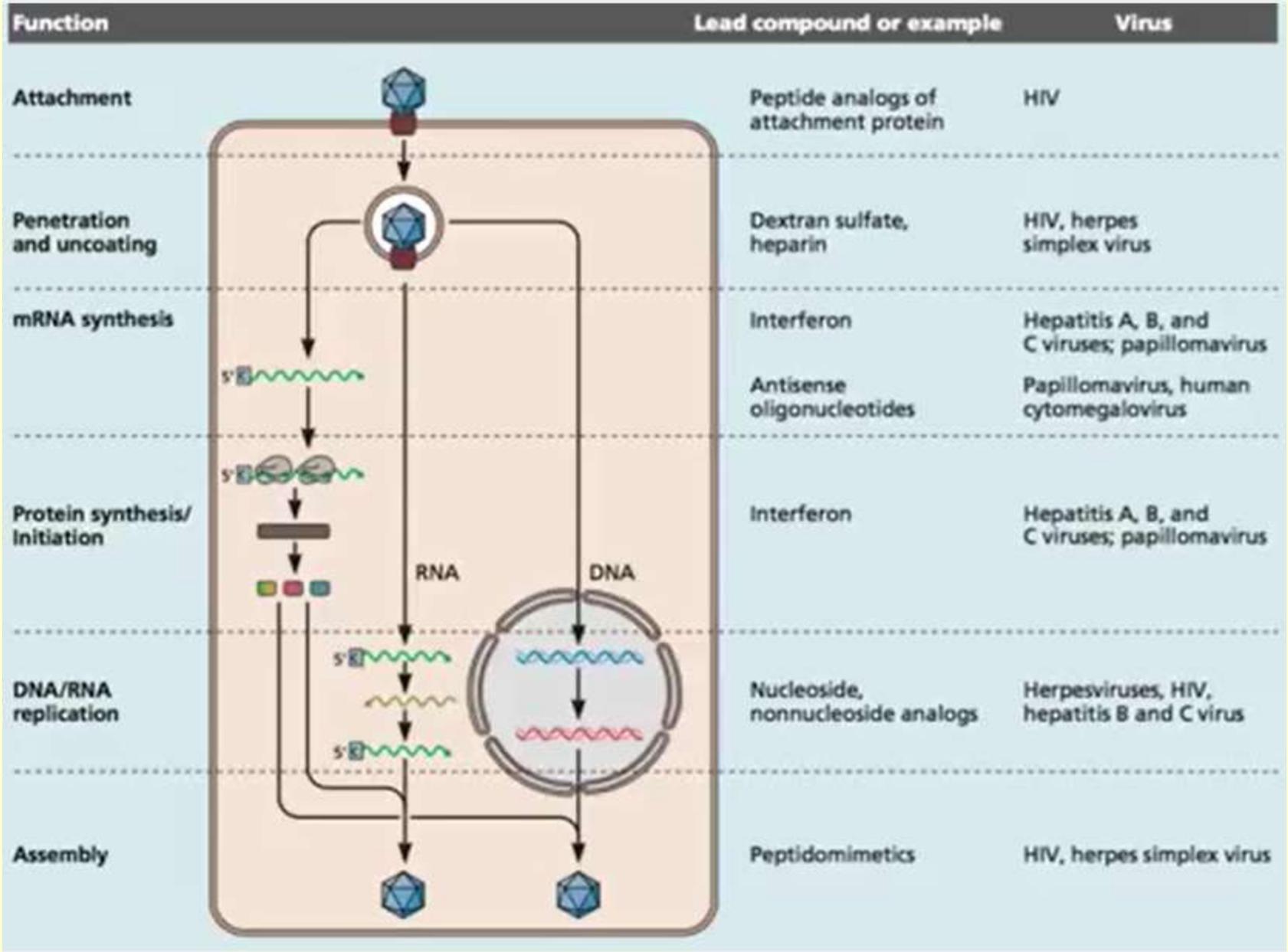
Una dose bassa non ha praticamente effetto

Farmaci antivirali

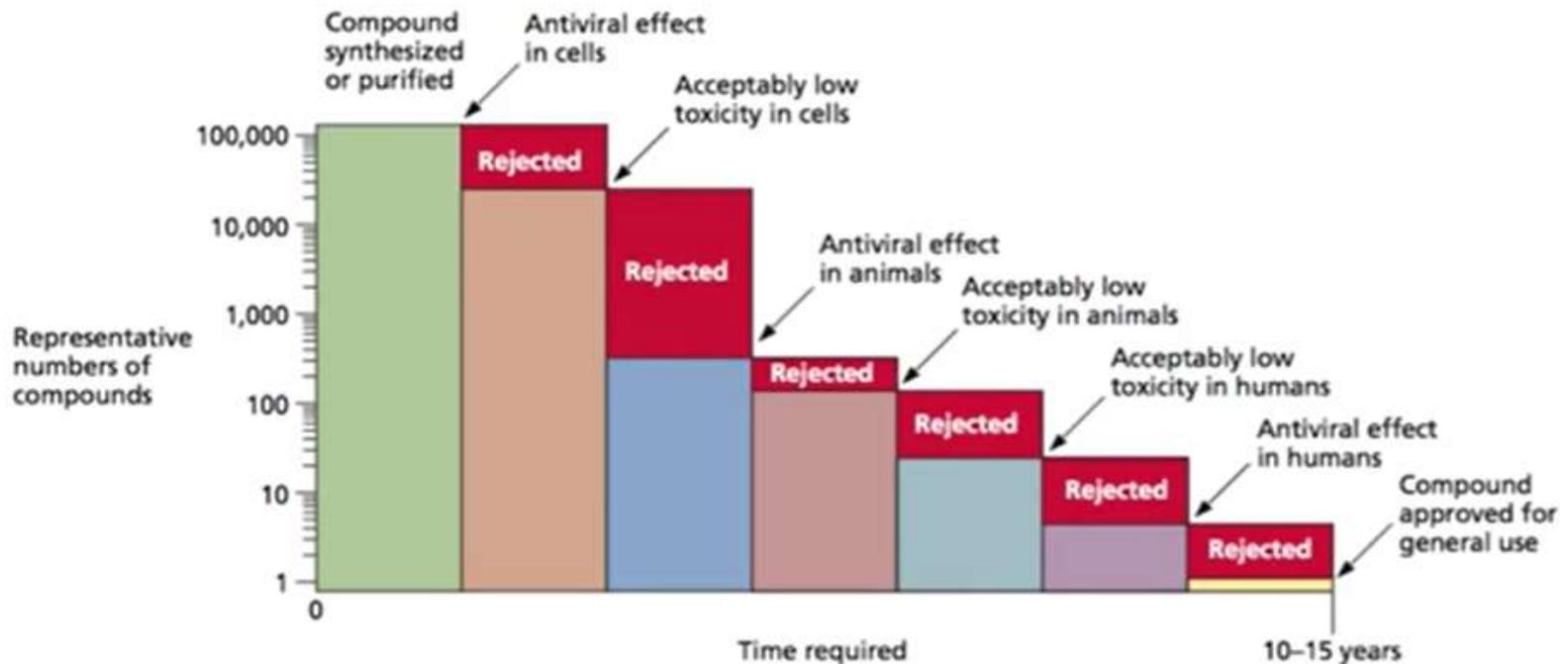
Tutte le fasi del ciclo virale sono bersagli potenziali per l'azione di antivirali. In teoria, l'inibizione di assorbimento/ penetrazione e di rilascio hanno il vantaggio di non richiedere l'ingresso del farmaco nella cellula. La maggior parte dei farmaci disponibili inibisce la replicazione del genoma



Farmaci antivirali



Significant hurdles stand in the way of finding effective antiviral drugs



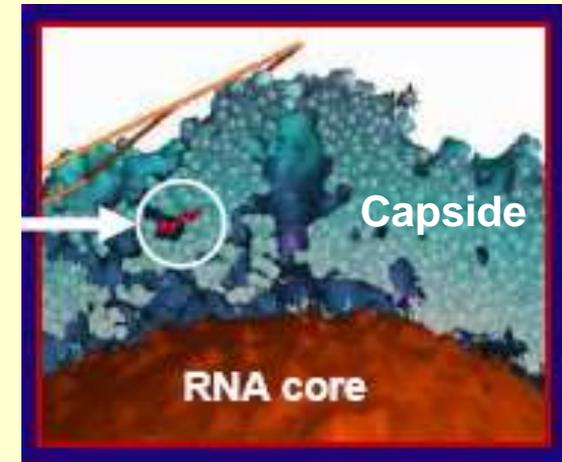
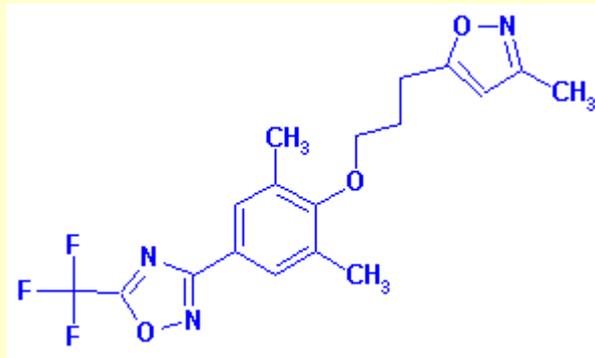
It is not unusual for the cost to bring an antiviral drug to market to **exceed \$100-200 million dollars!**

Inibizione ingresso

Enfuvirtide: attivo contro HIV. Inibisce la penetrazione.
Lo vedremo in dettaglio studiando HIV

Pleconaril: specifico per i picornavirus. Si lega ad una depressione formata nel capsid virale da VP1, con un duplice effetto:

- 1) Inibisce il legame con il recettore ICAM-1 (usato da ~90% dei ceppi di rhinovirus)
- 2) Inibisce la spoliatura



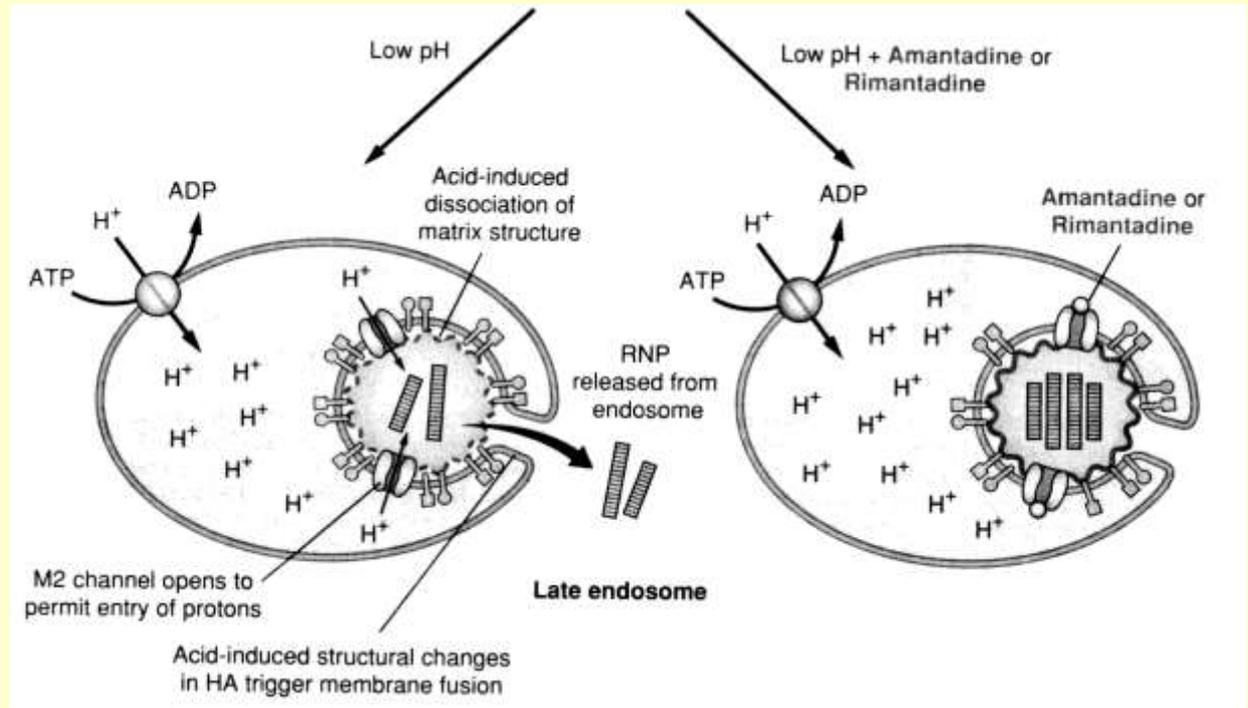
Effetti clinici:

Attualmente viene utilizzato solo contro il raffreddore da Rhinovirus e da Enterovirus.

Non impedisce la malattia, ma anticipa la guarigione completa di 1-2 giorni ed almeno 50% dei sintomi ha sensibile miglioramento in 4 giorni, anziché in 8

Inibizione spoliazione

**Amantadina,
Rimantadina:**
prevengono la
spoliazione di
ortomixovirus

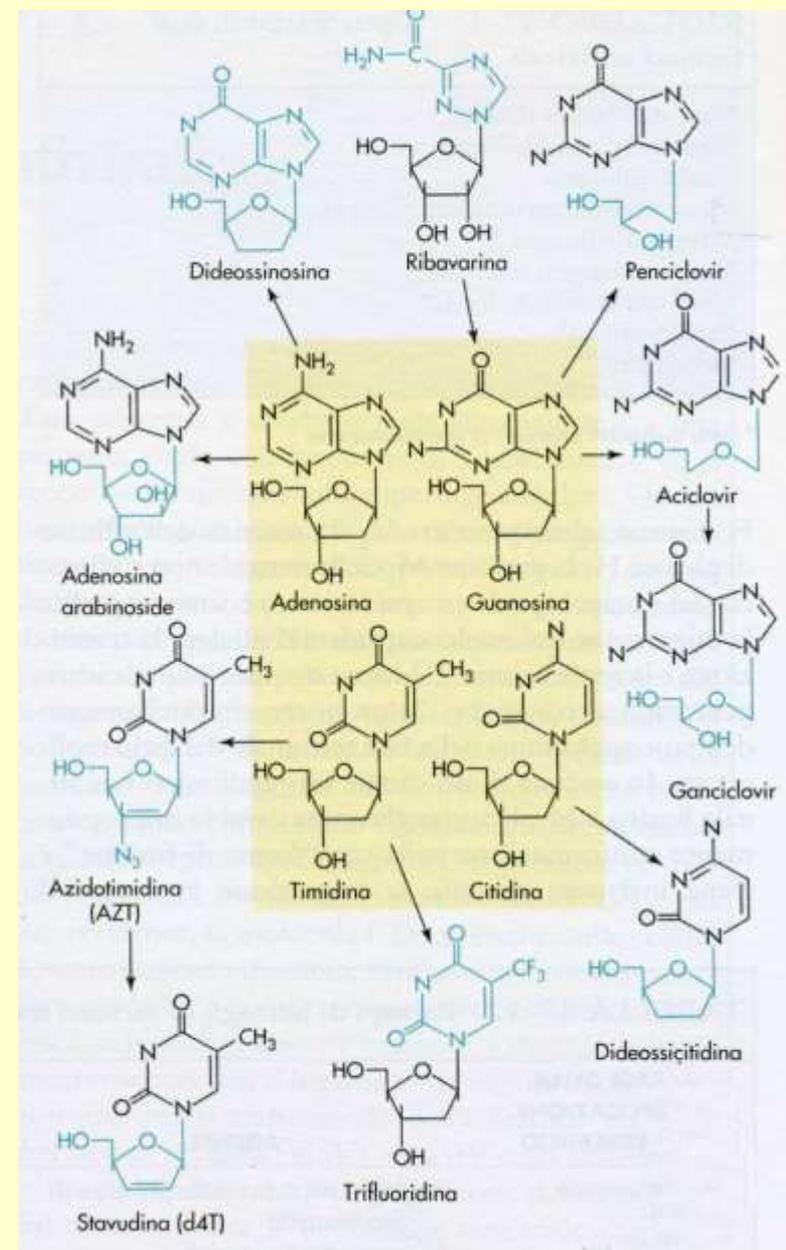


Dopo il legame con il recettore, il virus è internalizzato per endocitosi. Il basso pH nell'endosoma provoca la fusione fra le membrane cellulari e dell'involuppo, ed un flusso di protoni attraverso il canale formato dalla proteina virale M2 rilascia i geni virali nel citoplasma. Questi farmaci interagiscono con M2 inibendo il flusso di H^+ , e di conseguenza l'uncoating. Sono efficaci solo contro influenza A, provocano spesso effetti tossici, e selezionano rapidamente mutanti resistenti.

Inibizione replicazione

Spesso hanno come bersaglio le polimerasi virali. Per lo più sono analoghi di nucleosidi. Caratteristica comune: impossibilità di allungare la catena nascente

Ci sono anche inibitori non nucleosidici che, senza sostituire il substrato, inibiscono direttamente la polimerasi



Aciclovir

Profarmaco analogo della guanosina, attivo contro herpes simplex e varicella zoster.

Elion & Hitchings hanno vinto il premio Nobel nel 1988 per avere sviluppato farmaci che bloccano la sintesi di acidi nucleici in tumori (6-mercaptopurina per leucemia) e in cellule infettate (aciclovir)



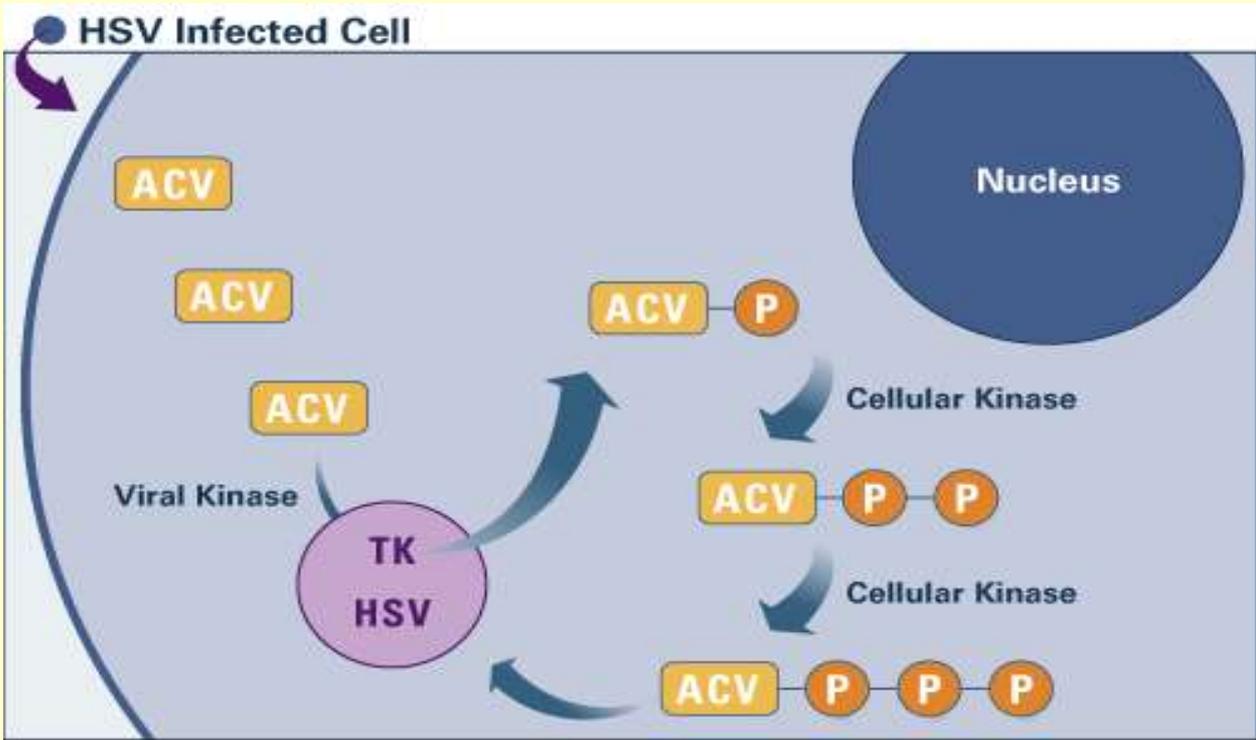
Azione selettiva su herpes simplex e varicella:

- 1) attivazione mediante fosforilazione specifica ad opera di una timidina chinasi virale; sulla forma monofosforilata intervengono chinasi cellulari \Rightarrow ACV-TP
- 2) alta affinità per la DNA polimerasi virale
- 3) incorporazione di ACV-TP nella catena nascente di DNA virale
- 4) terminazione della catena di neosintesi - manca l'OH in 3'
- 5) inattivazione selettiva, irreversibile, della DNA polimerasi virale

ACV in circolo ha emivita breve: sono stati sviluppati diversi derivati (es: valaciclovir e famciclovir) con maggiore biodisponibilità e stabilità.

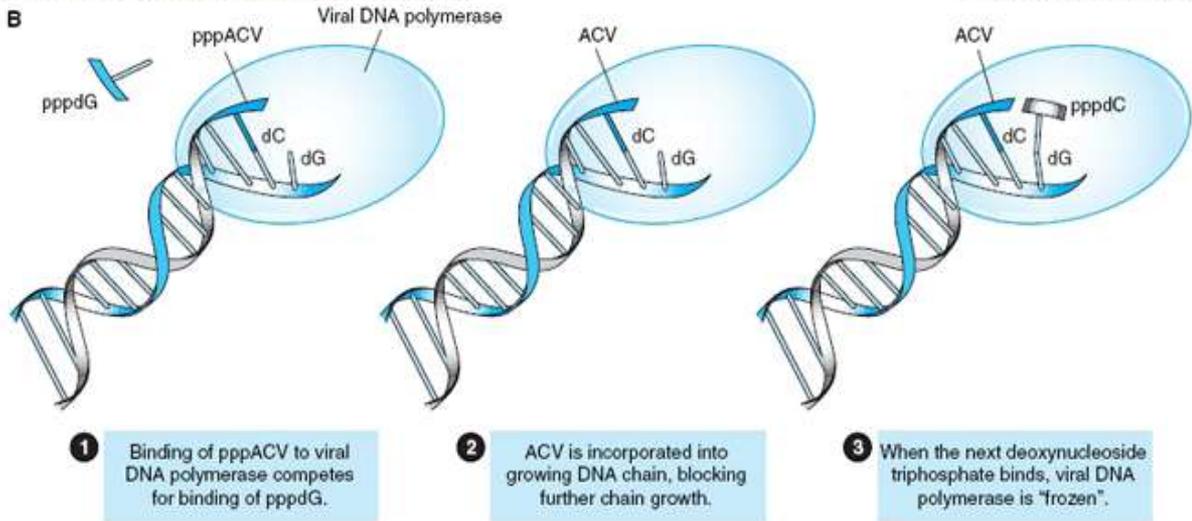
Frequente la possibilità di mutazioni resistenti, TK- o con polimerasi che non riconosce più ACV come substrato.

Inibizione replicazione



Meccanismo d'azione di acyclovir

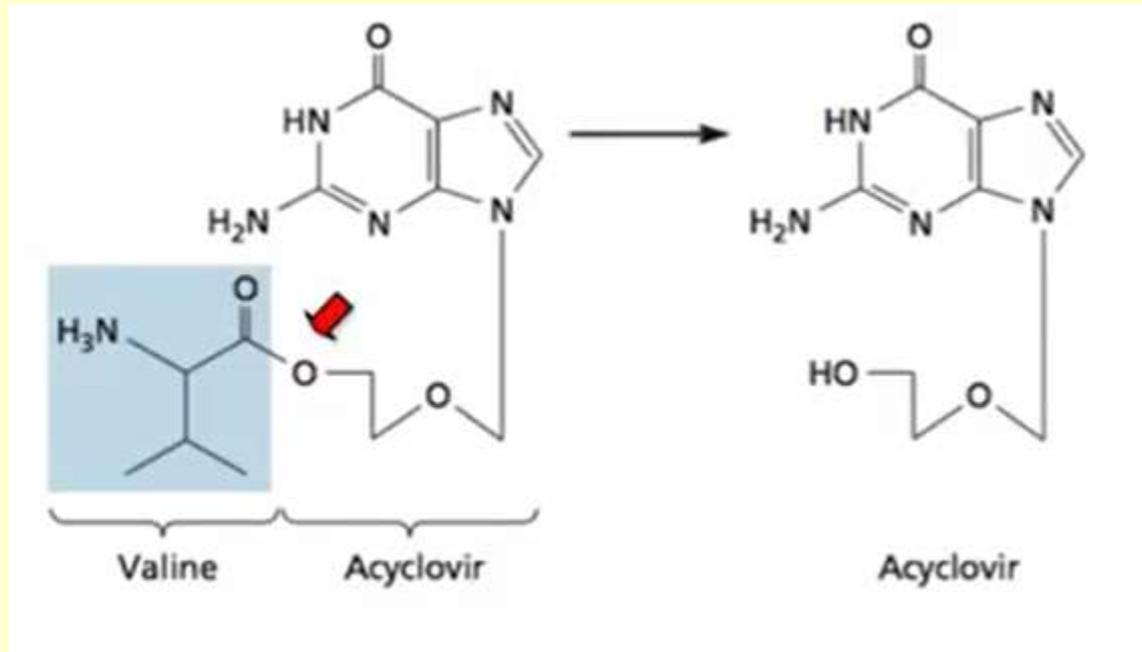
Il farmaco è fosforilato dalla timidina chinasi del virus herpes simplex o varicella-zoster, formando ACV monofosfato. Enzimi cellulari intervengono sul monofosfato formando il trifosfato. L'ACVppp lega la citosina, con binding competitivo verso la guanina, viene incorporato nella catena nascente, rendendo impossibile l'elongazione (manca l'ossidrile necessario). La polimerasi viene inibita irreversibilmente quando tenta di elongare la catena nascente.



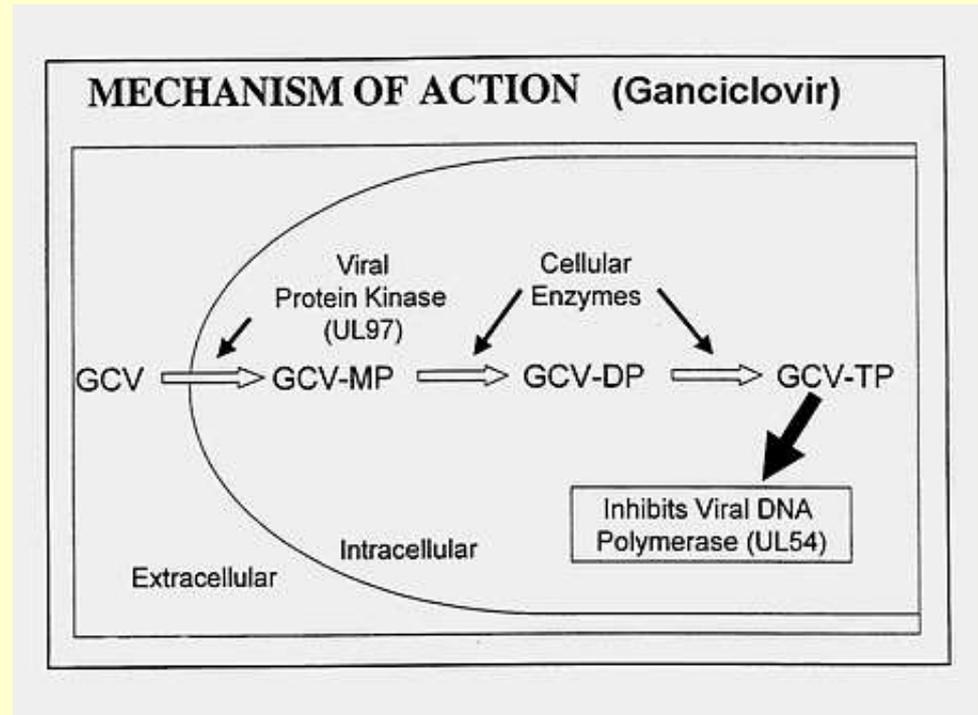
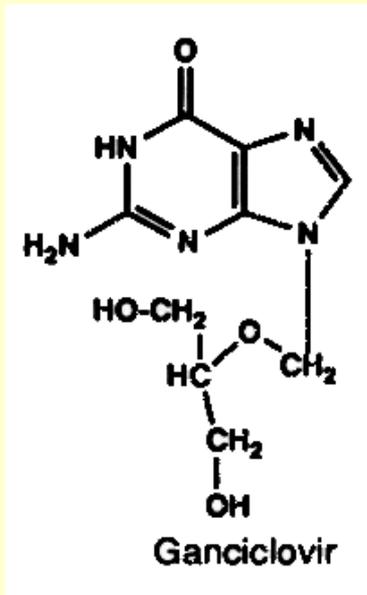
Inibizione replicazione

Sono stati sviluppati diversi derivati di Acyclovir,.

es Valacyclovir (valilestere), migliore biodisponibilità, viene convertito in ACV da enzimi cellulari. Preferito in caso di somministrazione orale



Ganciclovir



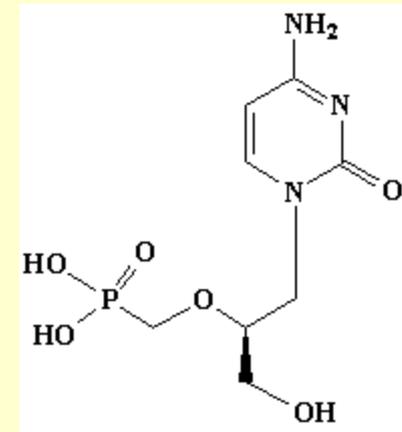
Utilizzato contro Citomegalovirus, è un analogo della guanina, usato nelle infezioni da citomegalovirus. Agisce come terminatore precoce nella sintesi del DNA virale. E' un profarmaco, prima fosforilato da un enzima virale (UL97), e poi da fosfatasi cellulari. Utilizzato soprattutto in gravi casi di infezione da CMV (AIDS), ed in trapiantati (anche in via preventiva). Il suo uso prolungato comunque è associato all'insorgenza di mutanti virali resistenti. L'effetto collaterale più frequente è neutropenia.

Altri analoghi nucleosidici

5-iodio-deossiuridina, trifluorotimidina: fosforilati da enzimi cellulari, utilizzati contro herpesvirus prima dello sviluppo ACV e GCV. Attualmente impiegati topicamente in cheratite erpetica (assenza di vascolarizzazione corneale limita gli effetti tossici)

Citosina- e Adenina- arabinoside: inibiscono sintesi DNA virale e cellulare, anche in cellule non infettate.

CIDOFOVIR



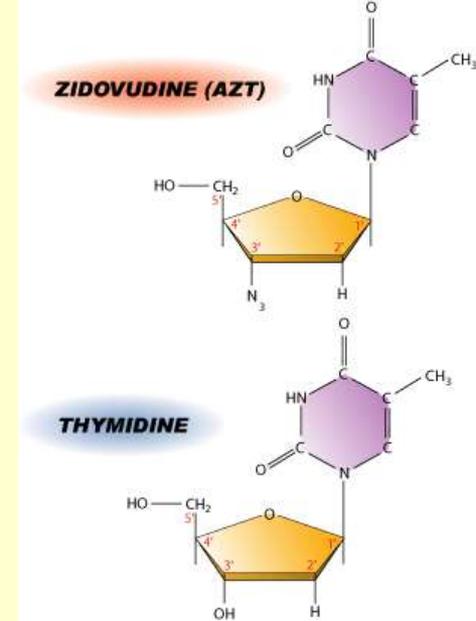
Analogo delle citidina, viene disforilato (ha già un P) da enzimi cellulari (non necessita l'intervento di enzimi virali, per cui anche mutanti nelle fosforilasi sono sensibili al farmaco).

Dopo la fosforilazione intracellulare, il cidofovir inibisce la DNA polimerasi virale (+ di 100 volte rispetto agli enzimi cellulari) e compete con la citosina. L'incorporazione nella catena di DNA nascente rallenta la sintesi e l'incorporazione di due molecole consecutive blocca completamente la sintesi.

Effetti collaterali: nefrotossicità.

Zidovudina - AZT

Analogo della timina, è stato il primo farmaco usato contro HIV. manca dell'OH in 3', e impedisce l'allungamento della catena di DNA. Ha affinità 100 volte maggiore per RT di HIV che per le DNA pol cellulari. Fosforilato da chinasi cellulari, si accumula in tutte le cellule, anche quelle non infettate (al contrario di ACV), con notevoli problemi di tossicità.



HIV sviluppa velocemente mutazioni che lo rendono resistente ad AZT.

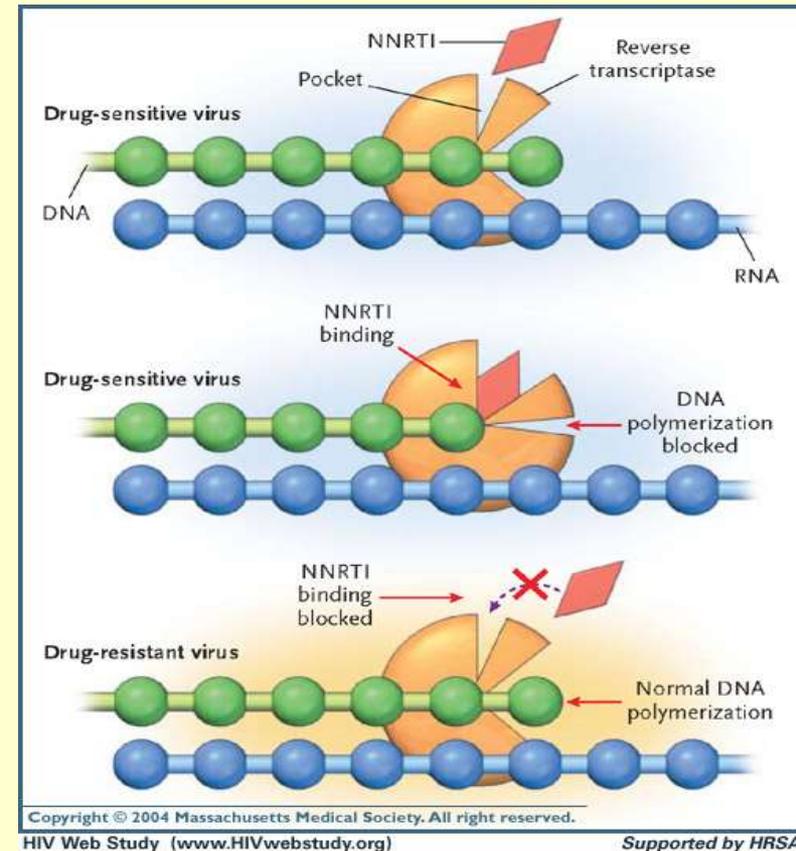
Sono stati sviluppati numerosi altri farmaci con principio simile ad AZT (3TC, ddI, stavudina, Tenofovir, ecc.)

Alcuni di questi farmaci (stavudina, adefovir, tenofovir, cc.) sono attivi anche contro il virus dell'epatite B

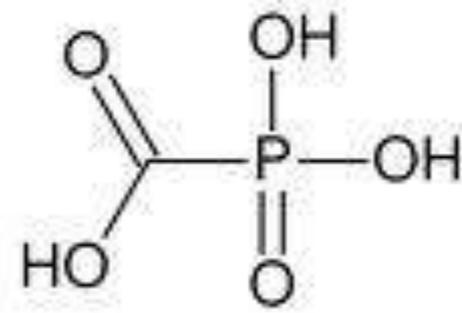
Inibitori non nucleosidici della retrotrascrittasi di HIV

Inibiscono la retrotrascrittasi legandosi direttamente all'enzima ed impedendone il funzionamento

(Nevirapina, delavirdina, ecc.)



Foscarnet



Inibitore non nucleosidico, utilizzato contro herpesvirus. Nefrotossico, usato per gravi infezioni ACV-resistenti. E' un analogo del pirofosfato (normalmente, è prodotto dalla DNA polimerasi durante la sintesi). Si attacca al sito della polimerasi che lega il pirofosfato, impedendo il funzionamento dell'enzima

Ribavirina

Agisce come ipermutageno. Funziona contro alcuni virus a RNA (V Resp Sinc, Ep C, ed altri).

E' un profarmaco (analogo di guanosina, deve essere trifosforilato)

Principio: se il tasso di mutazione dei virus a RNA, già elevato di per sè, aumenta, allora aumenta il N° di genomi non funzionali, con mutazioni letali

Può avere anche altri effetti, a seconda del virus: inibisce il capping di mRNA, RNA polimerasi, sintesi di nucleosidi

Numerosi effetti collaterali, anche gravi (anemia emolitica, astenia, dolori, nausea vomito, perdite di coscienza, diarrea, tosse)

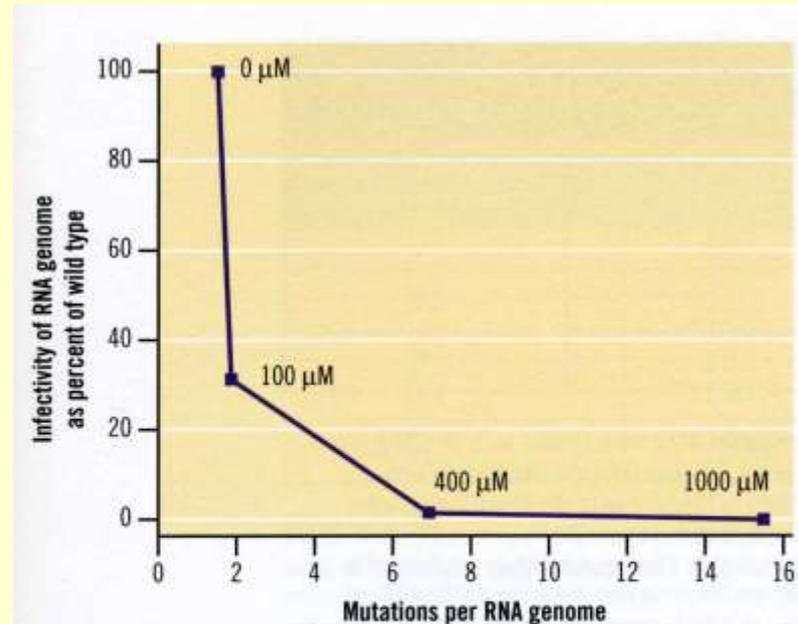
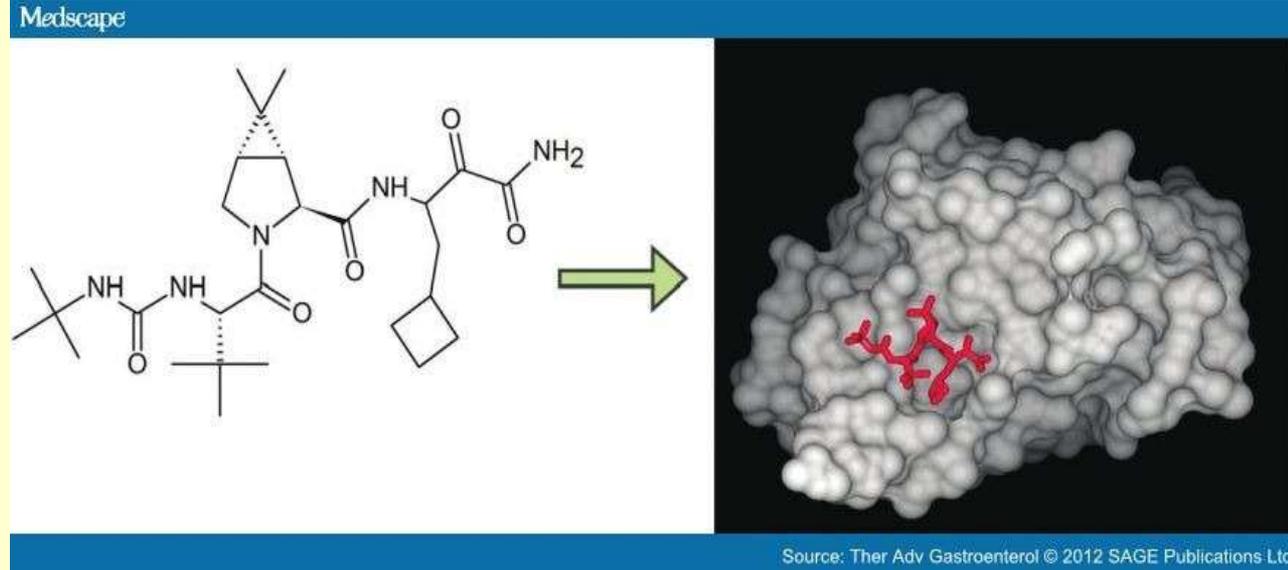


FIGURE 16.1 Ribavirin can initiate RNA 'error catastrophe' in a model virus. Poliovirus was grown in the presence of increasing doses of ribavirin and the infectivity per genome was plotted against the number of mutation per genome. The concentration of ribavirin is shown for each point. After Crotty S, Cameron CE, Andino R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001, 98: 6895–6900.

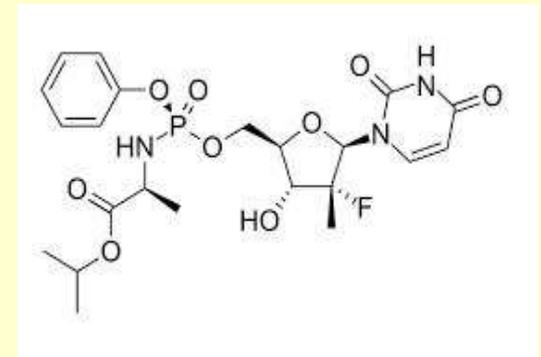
Farmaci contro Virus Epatite C

Recentemente sono stati introdotti 2 inibitori della NS3 proteasi (Boceprevir, Telaprevir) che formano un legame covalente con il sito attivo.



Sofosbuvir

Introdotta in UE nel 2013, è un profarmaco il cui principale metabolita, il 2'-deossi-2'- α -fluoro- β -C-metiluridine-5'-monofosfato, è un analogo nucleotidico che inibisce la RNA polimerasi virale.



Inibitori dell'integrasi di HIV

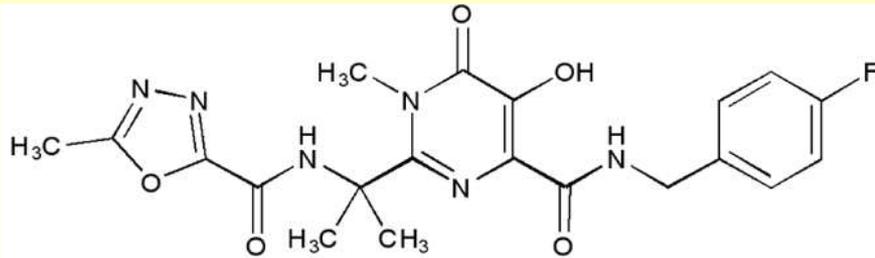


Figure 2. **The chemical structure of raltegravir**

Adapted with permission from Merck & Co., Inc.⁴⁹

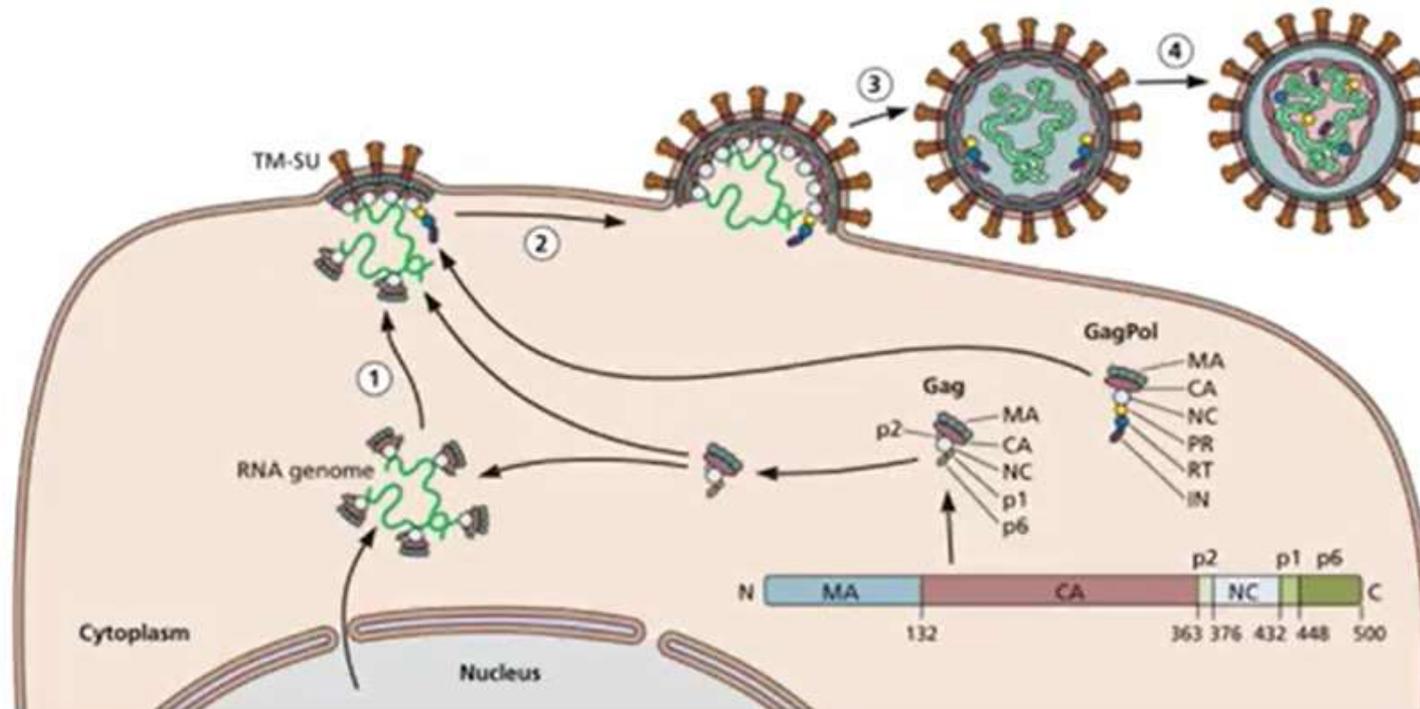
Raltegravir: blocca il sito attivo dell'integrasi, e quindi il provirus non si integra e non può essere trascritto

Inibitori della proteasi di HIV

Sono state sviluppate diverse molecole che inibiscono la proteasi di HIV. Le vedremo in dettaglio studiando HIV

Antiviral drugs that target HIV protease

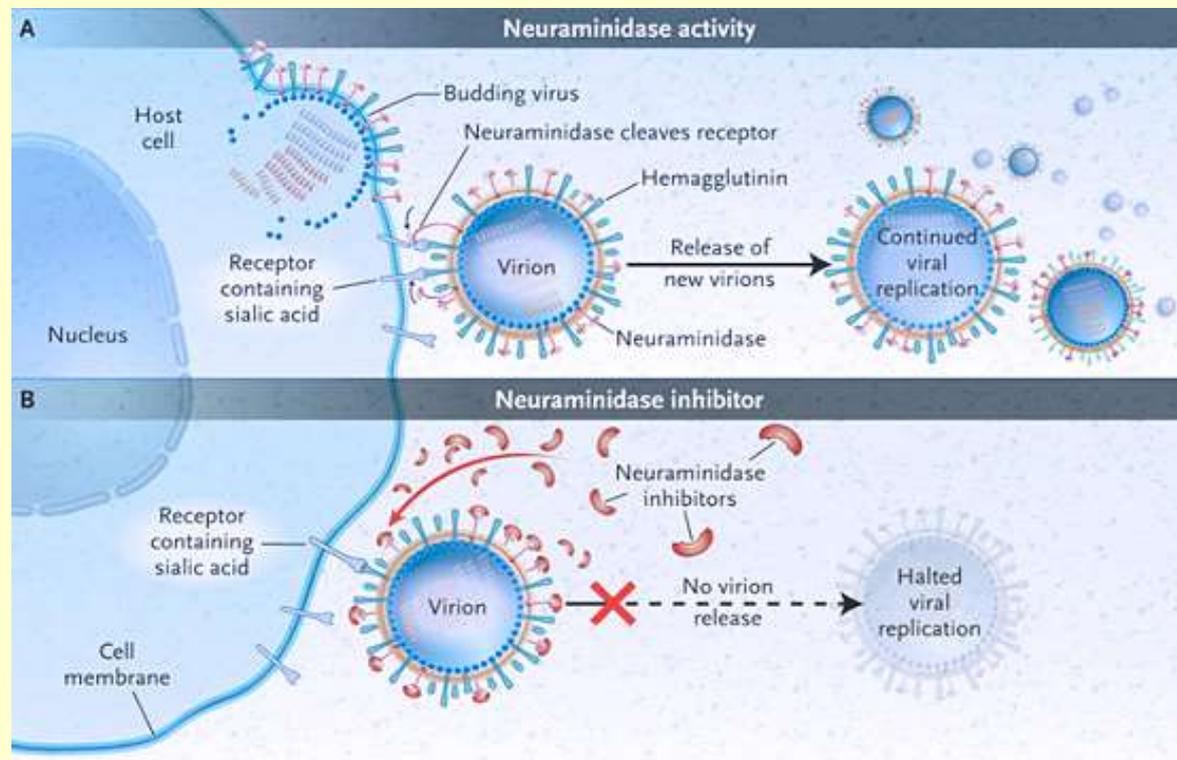
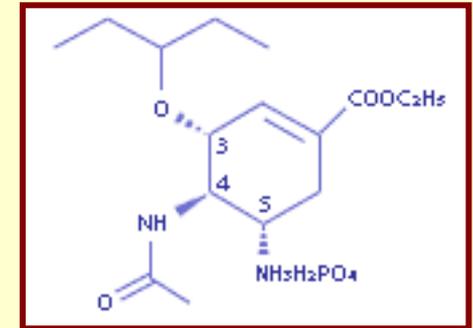
HIV protease absolutely required for production of infectious virions



Tamiflu

(principio attivo: oseltamivir)

Attivo contro i virus influenzali (A e B). Blocca la neuroaminidasi virale, necessaria per il rilascio dalla cellula infettata delle particelle virali neoformate



Zanamivir (Relenza): altro farmaco inibitore della neuroaminidasi

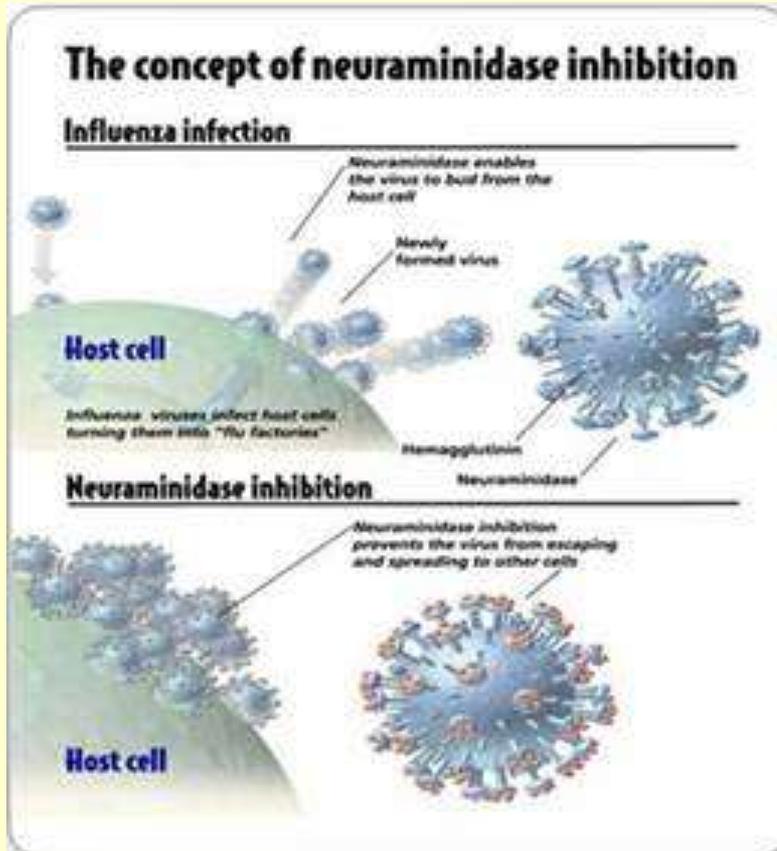
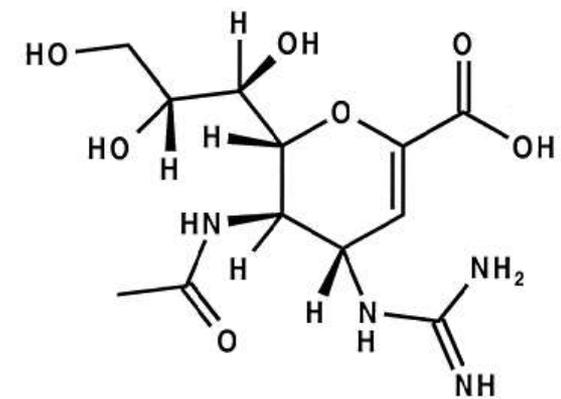


TABELLA 8-1 Sommario degli agenti antivirali

MECCANISMO DI AZIONE	AGENTE ANTIVIRALE	SPETTRO D'AZIONE
Inibizione della scapsidazione e della penetrazione del virus	Amantadina	Inf. A
	Rimantadina	Inf. A
Inibizione della neuraminidasi	Oseltamivir	Inf. A, Inf. B
	Zanamivir	Inf. A, Inf. B
Inibizione della DNA polimerasi virale	Acyclovir	HSV, VZV
	Famciclovir	HSV, VZV
	Penciclovir	HSV
	Valacyclovir	HSV, VZV
	Ganciclovir	CMV, HSV, VZV
	Foscarnet	CMV, resistente HSV
	Gdofovir	CMV, Adeno
	Trifluridina	HSV, VZV
Inibizione dell'ingresso del virus	Maraviroc	HIV
Inibizione della fusione virale	Enfuvirtide	HIV
Inibizione della trascrittasi inversa virale	Zidovudina	HIV
	Dideossinosina	HIV
	Dideossicitidina	HIV
	Stavudina	HIV
	Lamivudina	HIV, HBV ^a
	Nevirapina	HIV
	Delavirdina	HIV
	Efavirenz	HIV
Inibizione dell'integrazione virale	Raltegravir	HIV
Inibizione della proteasi virale	Saquinavir	HIV
	Indinavir	HIV
	Ritonavir	HIV
	Nelfinavir	HIV
	Lopinavir	HIV
	Inibizione della sintesi proteica virale	Interferon α
Inibizione dell'RNA polimerasi virale	Ribavirina	RSV, HCV ^a , febbre di Lassa
Inibizione della sintesi dell'mRNA virale	Fomivirsen	CMV

Adenovirus; CMV, Citomegalovirus; Inf. A, Influenza A; Inf. B, Influenza B; HBV, virus dell'epatite B; HCV, virus dell'epatite C; HIV, virus dell'immunodeficienza umana; HPV, papilloma virus umano; HSV, Herpes simplex virus; RSV, virus respiratorio sinciziale; VZV, varicella zoster.

^a Usato in combinazione con l'interferon.

Meccanismi di resistenza ai Farmaci Antivirali

La resistenza agli antivirali dipende da alterazioni geniche del virus, e si verifica con frequenza diversa a seconda dell'agente virale.

La probabilità di mutanti resistenti dipende da diversi fattori:

- Tasso di replicazione virale. Gli Herpesvirus replicano meno di HIV, HBV o HCV. Livelli più alti di replicazione sono associati a maggiori tassi di mutazione
- Tasso di mutazione. Diverso nei diversi virus. In genere, in virus a RNA ha tasso di mutazione maggiore di un virus a DNA
- Tasso di mutazione a livello dei singoli geni virali. es, per CMV il gene UL97 (per la fosforilazione dei nucleosidi) è più suscettibile alle mutazioni rispetto alla DNA polimerasi virale

Rilevazione delle resistenze agli antivirali

Test Fenotipici: metodo tradizionale di coltivazione del virus in coltura, in presenza di concentrazioni crescenti del farmaco antivirale. Viene misurata in genere la ID50 (maggiore per i virus resistenti rispetto ai virus sensibili). Si esegue contando le "placche" virali. Sono test lenti e richiedono l'isolamento virale e la crescita in coltura

Test Genotipici: Quando è nota l'esatta mutazione responsabile della resistenza, il sequenziamento del gene virale fornisce chiara indicazione della resistenza. Test rapido, ma si limita alle mutazioni conosciute e presenti nella banche dati. Inoltre se ci sono varie popolazioni di mutanti, vengono rilevate quelle più abbondanti. Se solo l'1% della popolazione virale ha la mutazione, generalmente non verrà rilevata ma il trattamento risulterà immediatamente inefficace).

Quantificazione virale: l'analisi quantitativa della carica virale (es mediante real time PCR) permette di valutare l'efficacia clinica del trattamento, Saggi rapidi che non richiedono l'esatta conoscenza della mutazione. Se il titolo virale non diminuisce, è evidente la resistenza. Permette inoltre di monitorare l'efficacia nel tempo del trattamento, rilevando incrementi di carica virale dovuti a resistenze PRIMA del peggioramento della situazione clinica